

ВЛИЯНИЕ РУТИНА НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА

Лукашов Р. И., кафедра фармацевтической химии;

Гурина Н. С., кафедра организации фармации

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Актуальность. На сегодняшний день лекарственные растения широко применяются в косметологии как средства антиоксидантного, противовоспалительного, ранозаживляющего действия. Одними из компонентов этих растений являются гидроксикоричные кислоты, простейшим представителем которых является кофейная кислота и ее эфир – хлорогеновая кислота. Также в растительном мире широко распространены флавоноиды, которые обладают такими же фармакологическими эффектами.

Для оценки возможности применения этих компонентов в косметологии целесообразно изучить их действия на клетки кожи – фибробласты в моделях оксидативного стресса, моделирующего стрессовые условия для кожи.

Цель. Исследовать влияние рутина на перекисное окисление липидов, вызванное пероксидом водорода, в лечебной и профилактической модели.

Материалы и методы. Для оценки влияния рутина на перекисное окисление липидов использовали следующую схему эксперимента:

клетки культивировали 1 сутки – отрицательный контроль; добавляли к культуре клеток после суточного культивирования 200 μ M пероксида водорода на 3 ч – положительный контроль (вызывал перекисное окисление липидов с образованием малонового диальдегида и других ТБК-активных продуктов), также использовали вариант внесения в культуру пероксида водорода на одни сутки; добавляли к культуре рутин в двух концентрациях (концентрации выбраны, исходя из токсичности вещества, полученной по морфологическим показателям) – контроль рутина; учитывая, что растворы рутина готовили с добавлением 20 % ДМСО в PBS, то для контроля растворителя к клеткам добавляли 2 % ДМСО (в культуре концентрация снижалась при разведении);

профилактическая схема – рутин вносили на одни сутки, затем вызывали окислительный стресс добавлением пероксида водорода на 3 ч;

лечебная схема – вносили к клеткам пероксид водорода на 3 ч и затем вносили БАВ на одни (двое) суток.

ТБК-активные продукты определяли в клеточной жидкости, которую получали путем ее слива с клеток и центрифугирования, и после гомогенизации культуры фибробластов дермы человека. Для этого сливали среду с флакона (T25), T25 промывали 3 мл PBS, сливали. Наливали 3 мл версена (в 1 л PBS 200 мг натрия эдетата) и давали постоять 3-5 мин, сливали. Добавляли по 0,5 мл раствора трипсина в T25. Трипсин распределяли по монослою, качая флаконы. Работали под микроскопом с увеличением 4x. Постукивали по дну T25 ладонью, чтобы клетки быстрее

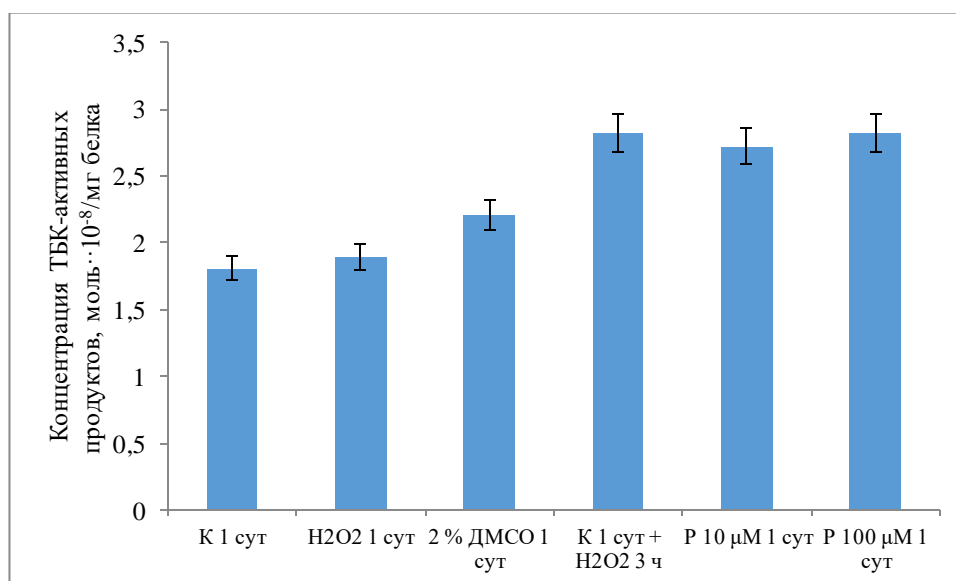
отошли. Весь процесс снятия занимает около минуты. Как только клетки открепились, заливали в каждый флакон по 3 мл модифицированной Дульбекко среды Игла с PBS. Сливали каждый образец пробирку и центрифугировали 3000 об/мин в течение 7 мин. Супернатант сливали. Клетки ресуспендировали в PBS и помещали в ультразвуковую ванну для гомогенизации на 30 мин.

Для оценки содержания ТБК-активных продуктов к 1 мл испытуемого образца культуральной жидкости или гомогената фибробластов добавляли 1мл PBS (рН 7,4), 0,5 мл 30 % раствора трихлоруксусной кислоты и 2 мл 0,8 % раствора ТБК.

Пробы помещали на 15 мин в кипящую водную баню, выпавший в осадок белок, отделяли центрифугированием в течении 10 мин при 1500-3000 об/мин. Следили, чтобы вода сильно не кипела и не произошло выпаривания. Пробирки прикрывали фольгой.

Полученный супернатант спектрофотометрировали при длине волны 532 нм против смеси реактивов (2 мл PBS рН 7,4, 0,5 мл 30 % раствора трихлоруксусной кислоты, 2 мл 0,8 % раствора ТБК).

Результаты и обсуждение. На рисунках 1, 2 и 3 представлены результаты оценки влияния рутина в концентрациях 100 и 10 μM на перекисное окисление липидов в профилактической и лечебной моделях в культуральной жидкости.

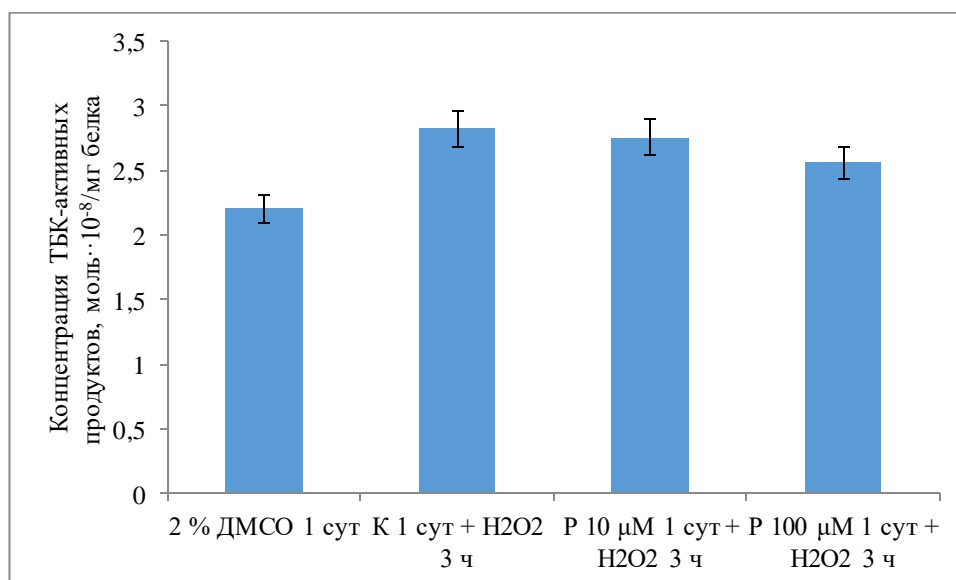


К 1 сут – контроль клеток без добавления H₂O₂ и БАВ, односуточное культивирование; H₂O₂ 1 сут – культивирование клеток с H₂O₂ в течение одних суток; 2 % ДМСО 1 сут – культивирование клеток с 2 % ДМСО в течение одних суток; К 1 сут + H₂O₂ 3 ч – культивирование клеток в течение одних суток с последующим добавлением H₂O₂ на 3 ч; Р 100 μM 1 сут – культивирование клеток с рутином в концентрации 100 μM в течение одних суток; Р 10 μM 1 сут – культивирование клеток с рутином в концентрации 10 μM в течение одних суток

Рисунок 1 – Концентрации ТБК-активных продуктов в контрольных опытах культуральной жидкости

Добавление к культуре фибробластов пероксида водорода на одни сутки, 3 ч, ДМСО и рутина в обеих концентрациях увеличивало содержание

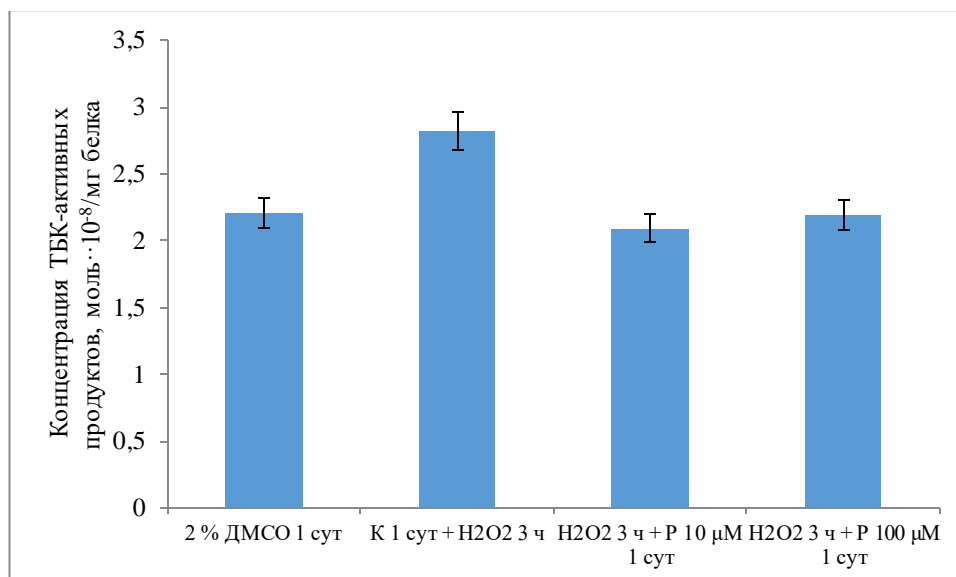
ТБК-активных продуктов в диапазоне от 4,7 % (отн.) до 56,3 % (отн.) в сравнение с контролем. При этом выдерживание пероксида водорода в течение 3 ч увеличивало окисление на 56,2 % (отн.) ($p = 0,084$) по сравнению с контролем. Аналогичная зависимость наблюдалась для рутина в обеих концентрациях. Концентрация продуктов была выше по сравнению с ДМСО на 25–30 % (отн.) ($p = 0,030–0,036$), что говорит о прооксидантном действии рутина, сопоставимым с пероксидам водорода ($p = 0,28$).



2 % ДМСО 1 сут – культивирование клеток с 2 % ДМСО в течение одних суток; К 1 сут + H₂O₂ 3 ч – культивирование клеток в течение одних суток с последующим добавлением H₂O₂ на 3 ч; Р 100 μМ 1 сут + H₂O₂ 3 ч – культивирование клеток с рутином в концентрации 100 μМ в течение одних суток с последующим добавлением H₂O₂ на 3 ч; Р 10 μМ 1 сут + H₂O₂ 3 ч – культивирование клеток с рутином в концентрации 10 μМ в течение одних суток с последующим добавлением H₂O₂ на 3 ч

Рисунок 2 – Концентрации ТБК-активных продуктов в культуральной жидкости по профилактической схеме

В профилактической модели рутин в обеих концентрациях и пероксид водорода сопоставим по концентрации ТБК-активных продуктов с только пероксидом водорода ($p = 0,075$) и больше только ДМСО на 25,0 % (отн.) ($p = 0,013$) и 16,2 % (отн.) ($p = 0,044$) соответственно, что говорит о синергизме окисления, вызванного ДМСО и рутином.



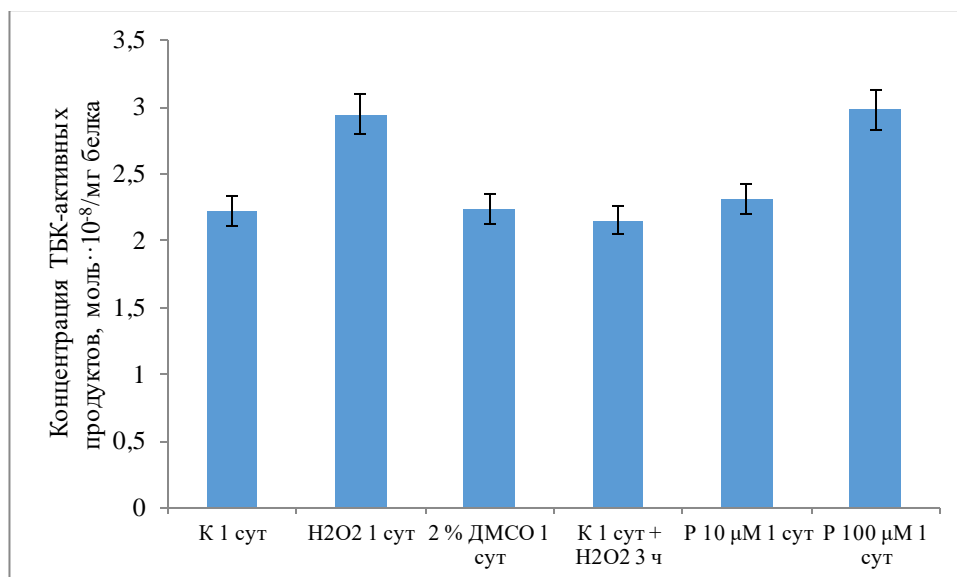
2 % ДМСО 1 сут – культивирование клеток с 2 % ДМСО в течение одних суток; К 1 сут + H₂O₂ 3 ч – культивирование клеток в течение одних суток с последующим добавлением H₂O₂ на 3 ч; H₂O₂ 3 ч + Р 100 μМ 1 сут – добавление H₂O₂ на 3 ч, затем культивирование клеток с рутином в концентрации 100 μМ в течение одних суток; H₂O₂ 3 ч + Р 10 μМ 1 сут – добавление H₂O₂ на 3 ч, затем культивирование клеток с рутином в концентрации 10 μМ в течение одних суток

Рисунок 3 – Концентрации ТБК-активных продуктов в культуральной жидкости по лечебной схеме

В лечебной модели рутин в обеих концентрациях снижал концентрацию ТБК-активных продуктов на 22,6 % (отн.) ($p = 0,045$) и 16,3 % (отн.) ($p = 0,054$) соответственно по сравнению с только пероксидом водорода. При этом снижение происходит до уровня ДМСО, что указывает на антиоксидантный эффект рутина.

В лечебной модели на культуральной жидкости рутин значительно снижал концентрации ТБК-активных продуктов по сравнению с контролем, что говорит об антиоксидантном действии. В профилактической модели – повышал данный показатель по сравнению с контролем, что говорит о синергизме действия с ДМСО и/или окислителем.

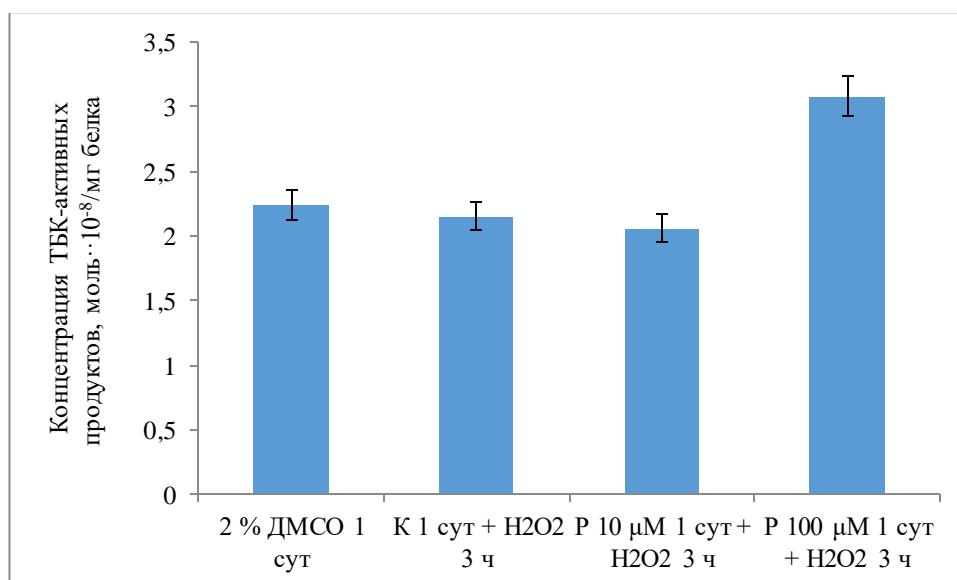
На рисунках 4, 5 и 6 представлены результаты оценки влияния рутина в концентрации 100 и 10 μМ на перекисное окисление липидов в профилактической и лечебной моделях в гомогенате фибробластов дермы человека.



К 1 сут – контроль клеток без добавления H₂O₂ и БАВ, односуточное культивирование; H₂O₂ 1 сут – культивирование клеток с H₂O₂ в течение одних суток; 2% ДМСО 1 сут – культивирование клеток с 2% ДМСО в течение одних суток; К 1 сут + H₂O₂ 3 ч – культивирование клеток в течение одних суток с последующим добавлением H₂O₂ на 3 ч; P 100 μМ 1 сут – культивирование клеток с рутином в концентрации 100 μМ в течение одних суток; P 10 μМ 1 сут – культивирование клеток с рутином в концентрации 10 μМ в течение одних суток

Рисунок 4 – Концентрации ТБК-активных продуктов в контрольных опытах гомогената фибробластов

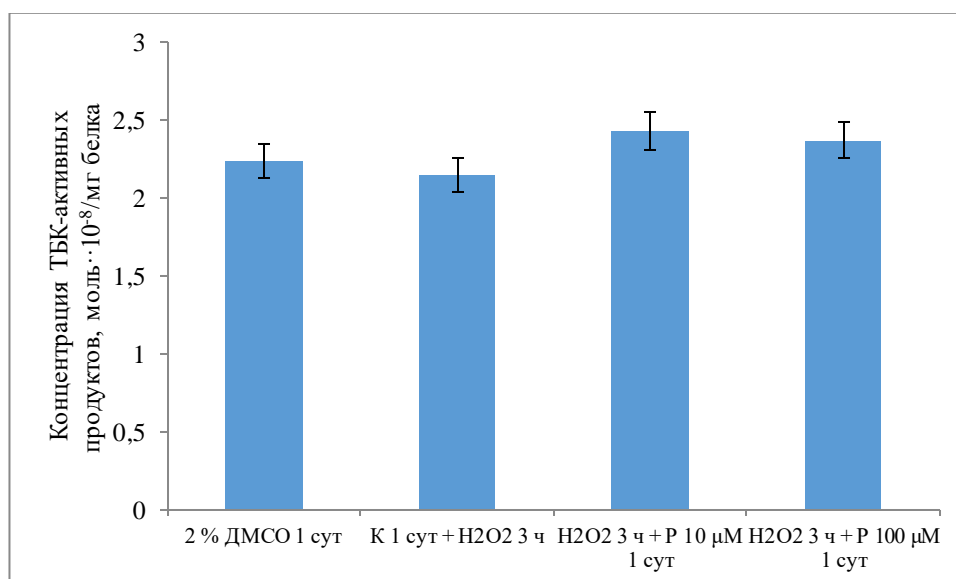
Добавление ДМСО, пероксида водорода на 3 ч и рутина в концентрации 10 μМ не изменяло перекисное окисление по сравнению с контролем ($p = 0,28$). Пероксид водорода в течение суток и рутин в концентрации 100 μМ увеличивали концентрацию ТБК-активных продуктов на $\approx 35\%$ (отн.) ($p \approx 0,01$) по сравнению с контролем.



2% ДМСО 1 сут – культивирование клеток с 2% ДМСО в течение одних суток; К 1 сут + H₂O₂ 3 ч – культивирование клеток в течение одних суток с последующим добавлением H₂O₂ на 3 ч; P 100 μМ 1 сут + H₂O₂ 3 ч – культивирование клеток с рутином в концентрации 100 μМ в течение одних суток с последующим добавлением H₂O₂ на 3 ч; P 10 μМ 1 сут + H₂O₂ 3 ч – культивирование клеток с рутином в концентрации 10 μМ в течение одних суток с последующим добавлением H₂O₂ на 3 ч

Рисунок 5 – Концентрации ТБК-активных продуктов в гомогенате фибробластов по профилактической схеме

Рутин в концентрации 100 μM и пероксид водорода увеличивал концентрацию ТБК-активных продуктов на 37,5 % (отн.) по сравнению с контролем. Остальные пробы значимо не отличались от контроля ($p = 0,38$).



2 % ДМСО 1 сут – культивирование клеток с 2 % ДМСО в течение одних суток; К 1 сут + H₂O₂ 3 ч – культивирование клеток в течение одних суток с последующим добавлением H₂O₂ на 3 ч; H₂O₂ 3 ч + Р 100 μM 1 сут – добавление H₂O₂ на 3 ч, затем культивирование клеток с рутином в концентрации 100 μM в течение одних суток; H₂O₂ 3 ч + Р 10 μM 1 сут – добавление H₂O₂ на 3 ч, затем культивирование клеток с рутином в концентрации 10 μM в течение одних суток

Рисунок 6 – Концентрации ТБК-активных продуктов в гомогенате фибробластов по лечебной схеме

Рутин в обеих концентрациях и ДМСО в лечебной модели значимо не отличались от контроля ($p = 0,42$).

В лечебной модели на гомогенате фибробластов дермы рутин не влиял на окислительные процессы. В профилактической модели – повышал данный показатель по сравнению с контролем, что говорит о синергизме действия с ДМСО и/или окислителем.

Выводы. В лечебной модели на культуральной жидкости рутин значимо снижал концентрации ТБК-активных продуктов по сравнению с контролем, что говорит об антиоксидантном действии. В профилактической модели – повышал данный показатель по сравнению с контролем, что говорит о синергизме действия с ДМСО и/или окислителем. В лечебной модели на гомогенате фибробластов дермы рутин не влиял на окислительные процессы. В профилактической модели – повышал данный показатель по сравнению с контролем, что говорит о синергизме действия с ДМСО и/или окислителем.